

English Abstract for Japanese Patent Publication No. 1-124387:

S7 1 PN="JP 1124387"

?t s7/9/1

7/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007705883

WPI Acc No: 1988-339815/198848

XRAM Acc No: C88-150161

Non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein - obtd. by recombinant  
DNA techniques from liver infected with non-A non-B hepatitis

Patent Assignee: MITSUBISHI CHEM IND LTD (MITU )

Inventor: KAMIZONO M; KITAMURA N; MATSUI R; NAKAANISHI S; TERANISHI Y

Number of Countries: 004 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 293274	A	19881130	EP 88400790	A	19880331	198848 B
JP 64002576	A	19890106	JP 87140586	A	19870604	198907
JP 1124387	A	19890517	JP 87283990	A	19871110	198926
CN 1031717	A	19890315				199010
US 5032511	A	19910716	US 88168357	A	19880315	199131
EP 293274	B	19910904				199136
DE 3864585	G	19911010				199142
JP 2590885	B2	19970312	JP 87140586	A	19870604	199715

Priority Applications (No Type Date): JP 87283990 A 19871110; JP 8778313 A  
19870331; JP 87140586 A 19870604

Cited Patents: 5.Jnl.Ref; EP 190972; EP 66296; EP 92249

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 293274	A	E	33		
-----------	---	---	----	--	--

JP 2590885	B2		13	C12N-015/09	Previous Publ. patent JP 64002576
------------	----	--	----	-------------	-----------------------------------

Abstract (Basic): EP 293274 A

A DNA fragment is claimed which contains a base sequence coding for a non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein occurring in cells of the liver affected with non-A non-B hepatitis. Also claimed is an expression vector in which a DNA fragment contg. a base sequence coding for non-A non-B hepatitis-specific antigen is introduced into a cloning site present downstream from a promoter and transformants obtd. using the vector.

USE/ADVANTAGE - The antigenic protein can be produced with low cost on a large scale. The protein can be used for the in vitro diagnosis of non-A non-B hepatitis. The DNA can also be used as a probe in hybridisation assays for detecting in vitro an infection by non-A non-B hepatitis virus.

0/7

Abstract (Equivalent): EP 293274 B

A DNA fragment which contains a base sequence coding for an antigenic protein specifically occurring in a host affected with non-A non-B hepatitis, said protein comprising the whole or a part of a sequence of 444 aminoacids given in the specification. (45pp)

Abstract (Equivalent): US 5032511 A

DNA fragment that encodes the prodn. of a non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein which occurs in liver cells infected with non-A non-B hepatitis, has been isolated. The aminoacid sequence of this antigenic protein has been determined. Expression vectors contg. this DNA fragment at a cloning site downstream from a promoter have been used to transform host cells to produce the antigenic protein. USE - The antigenic protein is a reagent for the rapid diagnosis of non-A non-B hepatitis and for the prodn. of vaccines.

(26pp)

Title Terms: NON; NON; HEPATO; SPECIFIC; ANTIGEN; PROTEIN; OBTAIN;

RECOMBINATION; DNA; TECHNIQUE; LIVER; INFECT; NON; NON; HEPATO

Index Terms/Additional Words: DEOXYRIBONUCLEIC; ACID

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): A61K-039/29; C07H-015/12;

C07K-003/00; C12N-001/20; C12N-005/00; C12N-007/00; C12N-015/00;

C12P-019/34; C12P-021/02; C12R-001/19; C12N-015/09; C12R-001-91

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B02-V02; B04-B02B; B04-B04A; B12-A01; B12-G02;

B12-K04A4; D05-H03B; D05-H04; D05-H06; D05-H07; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M421 M423 M720 M903 N135 Q233 V273 V752 V791

\*02\* M423 M710 M903 Q233 V753

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-124387

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)5月17日

C 12 N 15/00  
A 61 K 39/29  
C 12 N 1/20

A-8412-4B  
7252-4C  
G-8515-4B

※審査請求 未請求 発明の数 3 (全26頁)

⑮ 発明の名称 非A非B型肝炎特異抗原をコードするDNAを有する発現ベクタ

一、形質転換体および該抗原の産生方法

⑯ 特 願 昭62-283990

⑰ 出 願 昭62(1987)11月10日

⑱ 発 明 者 沢 井 達 郎 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑲ 発 明 者 紅 林 理 恵 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑳ 発 明 者 上 園 み ち る 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

㉑ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉒ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

非A非B型肝炎特異抗原をコードするDNAを有する発現ベクター、形質転換体および該抗原の産生方法

2 特許請求の範囲

(1) 非A非B型肝炎特異抗原をコードするDNAを含有するDNA断片を、プロモーターの下流に存在するクローニング部位に導入して成ることを特徴とする発現ベクター。

(2) プロモーターが調節因子により制御可能なものであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の発現ベクター。

(3) プロモーターが微生物で機能するプロモーターであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の発現ベクター。

(4) プロモーターが真核生物で機能するプロモーターであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の発現ベクター。

(5) 宿主を、非A非B型肝炎特異抗原をコード

するDNAを含有するDNA断片を、プロモーターの下流に存在するクローニング部位に導入して成る発現ベクターで形質転換して得られることを特徴とする形質転換体。

(6) 宿主が、大腸菌または枯草菌であることを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の形質転換体。

(7) 非A非B型肝炎特異抗原をコードするDNAを含有するDNA断片を、発現用ベクターのプロモーターの下流に存在するクローニング部位に導入し、ついで該DNA断片を導入した発現ベクターを宿主に導入して同宿主を培養し、該抗原を生成蓄積させ、これを取得することを特徴とする非A非B型肝炎特異抗原の産生方法。

3 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は、組換えDNA技術による宿主中での非A非B型肝炎発症時に特異的に見られる抗原をコードするDNAを含む発現ベクター、こ

れて形質転換された形質転換体及び該形質転換体を培養して非A非B型肝炎特異抗原を産生する方法に関する。

＜従来の技術及び発明が解決しようとする問題点＞

ウイルス性肝炎のうち、A型及びB型についてはそのウイルスが見出され、免疫学的方法による診断も可能となっている。

しかしながら、A型でもB型でもない、所謂非A非B型といわれる肝炎は、輸血後肝炎の90%以上を占めるとされている〔日本臨床、25、2724、(1977)；J. Biol. Med. (ジャーナル オブ バイオロジカル メディシン)、49、243、(1976)〕が、未だ原因ウイルスが同定されておらず、ヒトの非A非B型肝炎がテンパンジーへ感染可能であることが確認されているにすぎない〔Lancet I (ランセット)、459、(1978)；同、463、(1978)〕。

非A非B型肝炎に関連した抗原抗体系の検索は、多くの研究者によって患者の血清を中心になされているが、まだ明確な系は見出されてい

ない。そのため非A非B型肝炎の診断は、A型肝炎及びB型肝炎、更には肝障害をひきおこすことが知られている既知ウイルス、例えばCMV、HSV、EBV等による肝炎か否かの診断を行ない、これらに該当しない場合に非A非B型肝炎と診断する、所謂除外診断法によるため手間がかかるのが現状である。

特開昭61-176856号公報及び同61-56196号公報には、非A非B型肝炎の直接診断に有用な非A非B型抗原蛋白質をヒト及びテンパンジーの肝細胞から精製し、更にその治療に有用なモノクローナル抗体が提案されている。

しかしながら、例えば診断試薬として使用する場合には、多量の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質を必要とするが、多量の該抗原蛋白質を非A非B型肝炎発症時のテンパンジー等の肝細胞から精製することは必ずしも好適な方法とはいえない。

＜問題点を解決するための手段＞

そこで本発明者らは、該抗原蛋白質を、遺伝

子工学的手法により大量に生産すべく鋭意検討を重ねた結果、かかる目的に有用な非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする遺伝子を初めて、分離取得し、該遺伝子を含んだ発現ベクターを得るに至り、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明の要旨は、非A非B型肝炎発症時に特異的に見られる抗原、又はそれと同様の生理活性を有する非A非B型肝炎特異抗原をコードするDNAを含有するDNA断片をプロモーターの下流に存在するクロニング部位に導入して成ることを特徴とする発現ベクター、該発現ベクターで形質転換して得られる形質転換体及び該形質転換体を培養して非A非B型肝炎特異抗原を産生する方法に存する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において用いるDNA断片の非A非B型肝炎発症時に特異的に見られる抗原をコードするDNAを含有するDNA断片は、以下のような方法によって調製される。

まず、ヒト又はテンパンジーの非A非B型肝炎

発症個体（本発明においては、近年命名された所謂D型肝炎発症個体を含む）の肝組織をグアニジウムチオシアネート水溶液等中でホモジナイズし、Chirgwinらの方法〔Biochemistry (バイオケミストリー) 18、5294-5299、(1979)〕に従って、塩化セシウム平衡密度勾配超遠心法によって全RNAを沈殿として分離する。分離後、フェノール抽出、エタノール沈殿により全RNAを精製する。

抗原遺伝子のmRNAはpoly A部分を含むことが一般的であることから常法によりこれをオリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーにかけ精製し、ポリ(A)含有RNA (poly A + RNA) を単離しmRNA原料とする。このmRNA原料によりランダムプライマー法〔Yousuke Ebinaら、Cell (セル)、40、747-758、(1980)〕によりこれらpoly A<sup>+</sup> RNA に対するcDNAライブラリーを得る。例えば、6塩基程度の任意のプライマーを用い逆転写酵素により上記mRNAに対するcDNAをランダムに合成

する。さらにこの cDNA を DNA メチラーゼ (例えば EcoRI メチラーゼ) によりメチル化し、cDNA 中に存在する該制限酵素切断部位を保護した後、両端に該制限酵素切断部位入り DNA リンカー (例えば EcoRI リンカー (CGAATTCG)) を付加し、該制限酵素 (例えば EcoRI) により消化を行う。

このものをプラスミドあるいは λ ファージ等のクローニングベクターにクローニングする。例えば発現クローニングベクターである λ gt10 DNA (Young, R. A ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A.), 80, 1194-1195, (1983)) の EcoRI 部位に導入することができる。

かかる λ gt10 ファージ内に組み込まれた cDNA は λ gt10 ファージ上の β-gal 遺伝子の中に組み込まれるので該ファージの大腸菌への感染後 IPTG (イソプロピル-β-D-ガラクトピラノシド) 等の物質添加による該ファージ

上のラクトースオペロンプロモーターの誘導により β-ガラクトシダーゼとの融合タンパク質等として容易に発現が確認される。

この様にして、cDNA が組み込まれた λ gt10 ファージを富沢らの方法 (「バクテリオファージの実験法」197頁~174頁、岩波書店/1970年5月30日発行) により大腸菌に感染させ、IPTG 等を含む培地で培養する。形成されたブランクを非 A 非 B 型肝炎特異モノクローナル抗体を使用し、免疫スクリーニング等の方法によって選択することにより容易に目的とする cDNA を得ることができる。

この免疫スクリーニング法に使用する抗体は特開昭 61-176856 号公報、或いは同 61-56196 号公報に記載されている方法に従い調製することができる。スクリーニング法もこれらに記載されているウエスタンブロッティング法で行えばよい。

更に上記免疫スクリーニング陽性のブランクから富沢らの方法によりファージを増殖させ、

そのものから T. Maniatis らの方法 (Molecular Cloning (モレキュラー クローニング), Cold Spring Harbor [Laboratory PP 85 (1982)]) により DNA を精製し、適切な制限酵素例えば EcoRI 等で切断後、Maxam and Gilbert の方法 (Methods in Enzymology (メソッズ イン エンザイモロジー), 65, 497-560, (1980)) によって又は制限酵素で切断後、更に M13 ファージにクローンし Sanger らのジオキシン法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A.), 74, 5463, (1977)) によって目的 cDNA セグメントの塩基配列が決定できる。

この様にして非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする cDNA 断片が得られる。しかしながら、このようにして得られる DNA 断片は、通常非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする遺伝子の部分 cDNA 断片として得られる。完全長の cDNA は、上記と同様な方法で poly A<sup>+</sup>-mRNA を単離、

精製し、このものから岡山-Berg のベクター・プライマーの方法 (Molecular and Cellular Biology (モレキュラー アンド セルラー バイオロジー), 1, 161-170, (1982)) により cDNA ライブラリーを得る。この様にして調製した cDNA 含有プラスミドを常法、例えば D. Hanahan の方法 (J. Mol. Biol. (ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー), 166, 557, (1983)) により大腸菌等に形質転換し、アンピシリン耐性株を取得する。この形質転換体を先の部分、DNA 断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法等によりスクリーニングする。

かかるプローブの作成法としては、ストレプトアビジン法、ホトビオタン核酸および <sup>32</sup>P 核酸を使用したニクトランスレーション法等が好ましい。

このようにして得られた cDNA クローンを含むコロニーを培養し Birnboim らの方法 (Nucleic Acid Res. (ニュークレイック ア

シッド リサーチ) 2, 1513, (1979) に従ってプラスミド DNA を得、適切な制限酵素で切断後、上記の Maxam and Gilbert の方法によって又は、制限酵素で切断後、更に M / J ファージもしくはプラスミド pVC / 2 等にクローンし、上述の Sanger らのジデオキシ法によって目的の完全長 cDNA セグメントの塩基配列の決定を行う。

図 1 に非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする DNA の塩基配列を示した。

もとより、本発明に用いられる DNA 断片は必ずしもこれと同一の塩基配列を有することを要求されず、該 DNA 断片に含まれる DNA によってコードされる物質が、非 A 非 B 型肝炎特異抗原と同様の生理活性を有する物質をコードするものであれば、該塩基配列の一部が置換もしくは削除され、又は塩基が付加された塩基配列であってもよい。

本発明の発現ベクターは、上記のようにして得られた非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする

DNA を転写制御できる位置にプロモーターを含有する。

使用するプロモーターは、宿主中で発現可能ならば何でもよいが、更には制御可能なものが望ましい。

例えば大腸菌、枯草菌等の微生物を宿主とするときは、発現ベクターは、プロモーター、リボゾーム結合配列、非 A 非 B 型肝炎特異抗原遺伝子、転写終結因子、およびプロモーターを制御する遺伝子より成ることが好ましい。

プロモーターとしては、大腸菌、ファージ等由来のもの、例えば、トリプトファン合成酵素オペロン (trp)、ラクトースオペロン (lac)、リボプロテイン (lpp)、rec A、ラムダファージ PL、PR、TS 初期遺伝子 P<sub>22</sub>、P<sub>23</sub> プロモーター等が挙げられる。これらは化学合成により作成されたものでもよい。また、tac (trp: lac)、trc (trp: lac)、図 2 に示すような Pac (ファージ: 大腸菌) 等のハイブリッドプロモーターでもよい。

リボゾーム結合配列としては、大腸菌、ファージ等由来のものでもよいが、合成により作成したコンセンサス配列、例えば、AGGAGGTTTAA  
SD配列等の配列を持ったものが好ましい。非 A 非 B 型肝炎特異抗体遺伝子は、そのまま使用してもよいが、部位特異的変異 (バイオテクノロジー (BIO TECHNOLOGY) July, 636-639, (1984)) 等により余分な塩基配列 (non-coding 領域) を除いたものが好ましい。

転写終結因子は必ずしも必要ではないが、非依存性のもの、例えば lpp ターミネーター、trp オペロンターミネーター、リボゾーム RNA 遺伝子のターミネーター等を有している方が好ましい。

また発現ベクターは、通常のプラスミドを使用してもよいが大腸菌または枯草菌で多コピー数になるプラスミド、例えば pBR 322 系 プラスミド、pUB 110 系 プラスミド等を使用したものが好ましい。

さらに、これら発現に必要な因子の発現プラ

スミド上での配列順序は、5' 側上流から、プロモーター、SD 配列、非 A 非 B 型肝炎特異抗原遺伝子、構造遺伝子、転写終結因子の順に並ぶことが望ましい。また転写の制御に必要なリプレッサー遺伝子、マーカー遺伝子 (薬剤耐性等) 及びプラスミド複製開始点等の順序はとくに限定はされない。

宿主の形質転換方法としては、大腸菌では Molecular Cloning (モレキュラー クローニング) 250-253, (1982) 記載の方法、また枯草菌では Molec. Gen. Genet. (モレキュラー ジェネラル ジェネティクス), 168, 115-115, (1979) 及び Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A.), 82, 1072-1078, (1985) 記載の方法等の常法を用いることができる。

形質転換体の培養方法としては、大腸菌、枯草菌とも通常の培養を行い得る培地 (Molecular Cloning (モレキュラー クローニング),

68-73, (1972))を用いることができる。また培養温度も28~42℃で行えばよいが、好ましくは熱ショック蛋白質等の発現誘導の起らない範囲(28~30℃)で行うのがよい。

宿主からの目的物の精製方法としては、常法に従い、例えば宿主細胞をリゾチーム界面活性剤または超音波等により破砕した後、不溶性成分(非A非B型肝炎特異抗原は、この成分にある)を遠心分離により集め、これを界面活性剤(例えば0.01% SDS等)により可溶化した後、モノクローナル抗体(特開昭61-56196号公報及び同61-176856号公報)を用いたカラムクロマトグラフィーを通すことにより簡単に精製される。

また、真核細胞、例えば動物細胞においては次のようなものが好ましい。

プロモーターとしては、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、アポリポロテインB遺伝子のプロモーター、アポリポロテインA-I遺伝子のプロモーター、熱ショック

遺伝子のプロモーター(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.(プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A.), 78, 7038-7042, (1981)), メタロチオネイン遺伝子のプロモーター(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 6511-6515, (1980)), HSVTKプロモーター、アデノウイルスのプロモーター(Ad 2主要後期プロモーター(Ad 2MLPプロモーター)), レトロウイルスのLTR(Long Terminal Repeat)等が挙げられるが、SV40プロモーター及びメタロチオネイン遺伝子のプロモーターが好ましい。

発現ベクターは5'スプライス部位(5' splice junction donor site)、イントロン及び3'スプライス部位(3' splice junction acceptor site)からなるスプライス配列DNA(エキソン-イントロン接合部位、同接合部位周辺には共通の塩基配列が見出されており、イントロン領域が常にGTの2塩基(ドナー部位)で始まり、そしてAGの2塩基(アクセプター部位)で終了

するといういわゆるGT/AG則が成立する。

このようなスプライス配列DNAは、発現ベクター中に1以上存在してもよく、またその位置は、非A非B型肝炎特異抗原構造遺伝子の上流であっても、また下流であってもよい。

上記スプライス配列DNAの具体例としては、ウサギβ-グロビン遺伝子のエクソン1及びエクソン3(Science(サイエンス), 224, 339, (1979)参照)、メタロチオネイン遺伝子のプロモーター、エクソン1、2及び3並びにイントロンA及びBを含有するマウスメタロチオネイン-I遺伝子(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.(プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A.), 77, 6513, (1980)参照)中に存在するスプライス配列DNAが挙げられる。また、5'及び3'スプライス部位は同一の遺伝子に由来する必要はなく、たとえば、アデノウイルスDNA中に含まれる5'スプライス部位と18可変領域遺伝子に由来する3'スプライス部位を連結した配列を使用できる。

本発明の発現ベクターは、さらにポリアデニル化部位を含有する。ポリアデニル化部位は、非A非B型肝炎特異抗原構造遺伝子の下流に存在する。ポリアデニル化部位の具体例としては、SV40 DNA、β-グロビン遺伝子又はメタロチオネイン遺伝子に由来するものが挙げられる。また、β-グロビン遺伝子のポリアデニル化部位及びSV40 DNAのポリアデニル化部位が連結したものであってもよい。

本発明の発現ベクターは、形質転換体の選択を可能とする優性な選択マーカーを有していてもよい。発現ベクター中に選択マーカーがなくても、二重形質転換法(cotransformation)により、形質転換された本発明の動物細胞を選択できる。このような選択マーカーとしては、MTX(メソトレキセート)耐性を与えるDHFR遺伝子、HAT媒体中での形質転換tk<sup>-</sup>株の選択を可能とするヘルペス・シンプレックスウイルス(HSV)の $\omega$ 遺伝子、ジ-デオキシストレプトマイシン抗生物質D418に対する耐性を付与する大

腸菌のトランスポゾンTn5からのアミノグリコシドホスフォトランスフェラーゼ遺伝子、重層増殖による形態的区別を可能にするウシバビローマウイルス遺伝子、aprt 遺伝子等が挙げられる。

また、二重形質転換法により、本発明の発現ベクターで形質転換した動物細胞を選択するには、上記した選択マーカとなる遺伝子を含有するプラスミドその他のDNAを発現ベクターと一緒に形質転換し、選択マーカの発現による上記した表現形質により、形質転換細胞を選択できる。

発現ベクターは、大腸菌等の細菌由来の複製起点を有するプラスミド断片を含有すると、細菌中でのクローニングが可能となり有利である。このようなプラスミドとしてはpBRJ22、pBRJ27、pML等が挙げられる。

発現ベクターに使用されるプラスミドベクターの具体例としては、SV40初期プロモーター、ウサギのβ-グロビン遺伝子に由来するスプラ

イス配列DNA、ウサギのβ-グロビン遺伝子からのポリアデニル化部位、SV40初期領域からのポリアデニル化部位並びにpBRJ22からの複製起点及びアンピシリン耐性遺伝子を含有するpKCR (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブサイエンス U.S.A.), 78, 1528, (1981) 参照)、pKCRのpBRJ22部分をpBRJ27部分で置換し、ウサギβ-グロビン遺伝子のエクソン3中に存在するEcoRI部位をHindIII部位に変えたpKCR H2 (Nature (ネイチャー), 307, 605 参照)、BPV遺伝子及びメタロチオネイン遺伝子を含有するpBPVMT1 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 398, (1983) 参照)等が挙げられる。

発現ベクターで形質転換される動物細胞としては、CHO細胞、COS細胞、マウスL細胞、マウスC/27細胞、マウスFM3A細胞等が挙げられる。

本発明の発現ベクターの動物細胞への移入は

トランスフェクション法、マイクロインジェクション法等にすることができ、トランスフェクション法としては、Ca-PO<sub>4</sub> (Virology (ヴァイロロジー), 52, 456-467, (1973)) が最も一般的である。

移入により形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培地又は固着培地中に行なうことができる。

培地としては、MEM、RPMI/1640等が一般的である。

産生された蛋白の分離精製は、微生物により生産した場合と同様にしてできる。

(実施例)

以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り以下の実施例によって限定されるものではない。

参考例1 非A非B型肝炎感染テンパンジー肝臓よりのポリ(A)RNAの調製

肝臓よりチオシアン酸グアニジン塩化リチ

ウム法〔カサラ(Cathala)ら、DNA(ディーエヌ エー), 2, 329, (1983)〕に従いポリ(A)を有するRNAを下記の如く調製した。

非A非B型肝炎に感染したテンパンジーより感染肝臓を摘出し、直ちに液体窒素にて凍結した。このものを液体窒素とともにワーリングブレンダーに入れ、3,000 r.p.m. 2分間にて粉砕した。このものを5Mチオシアン酸グアニジン、10mMEDTA、50mMトリス-HCl (pH7) および8% (V/V) β-メルカプトエタノールからなる溶液100ml中でテフロンホモゲナイザー(5r.p.m.)にてさらに破砕し、可溶化した。この可溶化物20mlを遠心管に入っている5.7MGeCl<sub>4</sub>溶液10ml上に静かにのせ、Hitachi RPS 28-2ローターにて37,000 r.p.m., 20時間遠心後RNAを沈殿として回収した。このRNAの沈殿を0.1Mラウリル硫酸ナトリウム、10mMEDTA、10mMトリス-HCl (pH7.5) からなる溶液100mlに溶解しフェノール-クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿により回収し



た。得られたRNA約3.95mgを10mMトリス-HCl (pH 8.0) および1mMEDTAからなる溶液1mlに溶かした。65℃、5分間インキュベートし0.1mlの5MNaClを加えた。混合物をオリゴ(dt)セルロース・カラム(ビーエルバイオケミカル(P-L Biochemical)社製)クロマトグラフィー(カラム体積0.5ml)にかけた。吸着したポリ(A)を有するmRNAを10mMトリス-HCl (pH 7.5) および1mMEDTAからなる溶液で溶出し、ポリ(A)を有するmRNA約100μgを得た。

まずポリ(A)mRNA 10μgをRT緩衝液(20mMトリス-HCl (pH 8.8)、0.1MNaCl、2mMMgCl<sub>2</sub>、2mMMnCl<sub>2</sub>) 50μlに溶かし、ランダムプライマー-d(N)<sub>6</sub>(ビーエルバイオケミカル(P-L Biochemical)社製) 8μgを加え、95℃で3分間加熱して変性させた。これを室温まで徐冷し、ランダムプライマーをアニールさせた。このものに10mM\*dNTP 10μl、逆転写酵素225u(宝酒造社製)を加え、水を

を得た。このものを上記したとおり、フェノール抽出し、除タンパクした後、エタノール沈殿を行ってDNAを精製後、風乾した。

このものに50mMトリス-HCl (pH 7.5)、1mMNa<sub>2</sub>EDTA、5mMDTT 20μl、100uMS-アデノシル-L-メチオニン2μl、1.8mg/ml EcoRIメチラーゼ0.2μlを加え、37℃で15分間反応させ、DNA断片上のEcoRI制限酵素切断部位のメチル化を行ない、その後70℃で15分熱処理を行って酵素を失活させた。

次に、3'リン酸化したEcoRIリンカー(00AATTCC)を全合成DNA分子数の100倍になる様に加え、10倍濃度のT<sub>4</sub>DNAリガーゼ緩衝液(0.5Mトリス-HCl (pH 7.5)、60mMMgCl<sub>2</sub>、10mMDTT)を5μl加え、0.1MATP 5μl、T<sub>4</sub>DNAリガーゼ5uを加え計50μlの系とし、4℃/6時間反応させた後、70℃で10分間加熱して酵素を失活させた。次に10倍濃度のEcoRI緩衝液(15Mト

加えて計100μlの系とし、4℃で1時間反応させた。

上記反応液50μlを使用し10mMNAD 2μl、10mM\*dNTP 10μl、RNase H 5u、大腸菌リガーゼ1u、大腸菌DNAポリメラーゼ16.3u、10倍濃度のT<sub>4</sub>DNAリガーゼ緩衝液(0.1Mトリス-HCl (pH 7.5)、0.1MDDTT、60mMMgCl<sub>2</sub>) 10μlを加え、計100μlの系とし、37℃で1時間反応させ、2本鎖DNAを合成した。

上記の様にして得た2本鎖DNAを同量の水飽和フェノールで抽出し、エーテルで水層のフェノールを除いた後、エタノール沈殿を行った。

得られた沈殿を50μlの水に溶かし、10倍濃度のT<sub>4</sub>DNAポリメラーゼ緩衝液(0.33Mトリス酢酸(pH 7.9)、0.66M酢酸カリウム、0.1M酢酸マグネシウム、5mMDTT) 10μl、10mM\*dNTP 10μl、T<sub>4</sub>DNAポリメラーゼ6uを加え、100μlの系とし、37℃/時間反応させ、2本鎖の平滑末端をもったDNA

リス-HCl (pH 7.5)、0.5MNaCl、60mMMgCl<sub>2</sub>)を10μl、EcoRI 100uを加えて計100μlの系とし、37℃で2時間反応させ、余分なリンカーを切除した。さらにBio Gel A-50 (0.3cm×32cm)(Bio RAD社製)にこの反応液を通し、10mMトリス-HCl (pH 7.5) 6mMMgCl<sub>2</sub>緩衝液にて流出し、余分なEcoRIリンカーを除去し、EcoRIリンカーの付いた二本鎖cDNAを精製した。

得られたEcoRIリンカー付二本鎖cDNA断片を用い、EcoRIで切断したλgt11DNA 10μgと10倍濃度のT<sub>4</sub>DNAリガーゼ緩衝液(前述) 10μl、0.1MATP 10μl、T<sub>4</sub>DNAリガーゼ10uを加え計100μlの反応系で4℃/6時間反応させλgt11DNAに上記二本鎖cDNA断片を挿入した。

λファージパッケージングキット(プロメガ Biotech社製)を用い上記DNAをλファージ粒子中へ導入した。パッケージングの手順はキットの説明書に従い行った。

このDNAパッケージングを終了した $\lambda$ gt11ファージを常法(バクテリオファージ実験法 99頁~174頁、岩波書店1970年5月30日発行)、富沢らの法により、大腸菌Y1090株に感染させブランクを形成させた。約20万個のブランクより以下に示すような免疫スクリーニング法により陽性のクローン1個を得た。この免疫スクリーニングに使用した抗体は特開昭61-176856号公報に記載されている方法で調製したものである。

まず $\lambda$ gt11に感染したY1090(Young R.A.ら; Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A.), 80, 1194-1198, (1983))を42°Cに保温した上層軟寒天とともにシャーレにまき、42°Cに5時間放置した。次に10 mM IPTGを含んだニトロセルロースフィルター(8&S社製BA-83ポアサイズ0.2  $\mu$ m)をその上に置き37°Cにて3~4時間培養した。このニトロセルロースフィルターをTBS緩衝液

液(10 mM トリス-HCl (pH 7.5) 50 mM NaCl)で軽く洗い、J多ゼラチンを含むTBS緩衝液400 mlに浸し、40°C、1時間振とうを行ってニトロセルロースフィルターのブロッキングを行った。次に非A非B型肝炎特異抗原に対するモノクローナル抗体( $OD_{280}=4.3$ )をJ多ゼラチンを含むTBS緩衝液に400分の1希釈になるように加え、フィルター1枚につき2 mlになる様にビニール袋にフィルターとともに入れ、室温で16時間反応させた。次に0.05% Tween 20を含むTBS緩衝液400 mlにて10分間3回洗浄し、標識2次抗体である抗マウスIgG-PAP(フォースラディシュベルオキシダーゼ)(Bio Rad社製)をJ多ゼラチンを含むTBS緩衝液に1000分の1希釈に加え、フィルター1枚につき2 mlになる様にビニール袋にフィルターとともに入れ、室温で2時間反応させ、同様に0.05% Tween 20を含むTBS緩衝液400 mlにて10分間3回洗浄した。発色はフィルターを4-Chloro-1-

naphthol (Bio Rad社製)1.2 mgを過酸化水素水を含む20 mlのTBS緩衝液に浸して行った。発色終了後、フィルターは水でよく洗い水を入れたビニール袋に入れて冷暗所に保存した。

このようにしてポジティブなブランクを1個得た。このポジティブブランクのシングルブランクアイソレーションを3度行った。3度とも免疫スクリーニングを同様にを行いポジティブであることを確認した。

次にこのファージを大量に培養し、そのDNAを精製した。まずY1090菌をNZ培地(NZアミン10 g、NaCl 5 g、5 mM MgCl<sub>2</sub>を水1 Lに加え、pH 7.2に調整)10 mlで一晩培養した。このものを1 mlにm.o.i.(マルチプリシティ オブ インフエクション)0.1になる様にファージを感染させ、37°C10分間放置後、NZ培地1 Lに移し菌が溶菌するまで7~8時間37°Cにて振とう培養を行い、クロロホルム5 mlを加え、さらに30分間振とうを続けた。次に菌体残査を6,500 r.p.m.10分間の遠心分離

により除去し、上清にNaCl 19 g、ポリエチレングリコール70 gを加えよく溶かしてから4°Cで一晩放置した。6,500 r.p.m.20分の遠心分離で沈殿を集め、よく水滴を切り沈殿を20 mlのTM緩衝液(10 mM トリス-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>)に溶かし、DNase I、RNase Aをともに10  $\mu$ g/mlの濃度になる様に加え、37°Cで1時間反応させた。

次に、20 mlのクロロホルムを加えて攪拌し、ポリエチレングリコールをクロロホルムに溶解させて水層からとり除去した。この水層をさらに28,000 r.p.m.で60分の超遠心分離にかけ、ファージ粒子のペレットを得た。このペレットを1 mlのTM緩衝液にとかし、CsCl密度勾配遠心(33,000 r.p.m.20時間)により $\rho=1.45 \sim 1.50$ のファージ粒子を含んだ分画を得た。TM緩衝液に対し一晩透析を行った後、プロテインアゼKを100  $\mu$ g/mlになる様に加え、37°Cで1時間反応させた。その後、同量の水飽和フェノールを加えゆるやかにフェノール

ル抽出を行った。6,500 r.p.m. / 10 分間の遠心分離の後、水層をとり出し、透析チューブに入れて水に対して4℃で一晩透析を行った。この様にして、約5μgのDNAが得られた。

このDNA 100 μgをEco RI / 100 uで前述の緩衝液系100 μL中にて37℃反応して切断したところ、390 bpと345 bpのcDNAセグメントがファージDNAに挿入されていることが判明した。この2つのEco RIフラグメントをクローニングベクターであるpUC 119のEco RI部位に再度クローニングし、ジデオキシ法にて市販のプライマーCAAGGAAACA GCTATGACおよびAGTCACGACGTTGTAを用いて夫々についてその塩基配列を決定した。2つのDNAの結合部分の塩基配列はこのcDNA断片の内部にあるBam HI、Eco RV部位を同部位に特異的な制限酵素で切断し、得られるBam HI-Eco RV DNAフラグメントをpUC 119のBam HI、Bam I部位に挿入して同様にジデオキシ法にてそのフラグメントの塩基配列を決定した。

沈殿によりDNAを回収した。Kpn Iで切断した該DNA約200 μgを40 mMカコジル酸ナトリウム、30 mMトリス-HCl (pH 6.8)、1 mM CaCl<sub>2</sub> および0.1 mMジチオスレイトール(以下DTTと略記する)からなる緩衝液(以下TdT緩衝液と略記する)にdTTPを0.25 mMとなるように加えた溶液200 μLに加え、さらに8 uのターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(以下TdTと略記する)(P-L Biochemicals社製)を加えて、37℃で11分間反応させた。ここでpCDV / のKpn I切断部位の3'末端ポリ(dT)鎖が約67個付加された。該溶液からフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿によりポリ(dT)鎖の付加したpCDV / DNA約100 μgを回収した。該DNAを10 mMトリス-HCl (pH 7.5)、6 mM MgCl<sub>2</sub> および100 mM NaClからなる緩衝液150 μLに加え、さらに360 uのHpa Iを加え、37℃で2時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動かけ、約3.1

該cDNA断片は、図-3に示す通りの塩基配列を有する。これは非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする遺伝子の部分cDNA断片であった。

参考例1 完全長の遺伝子を持ったcDNAの取得

参考例1記載のとおりにしてmRNAを調製し、岡山ベクターにより常法(Molecular cloning, PP 211, 1982)に従いcDNAを合成する。以下にcDNAの合成法を記す。

pCDV / (Okayama & Berg (オカヤマ アンド バーク), Mol. Cell. Biol. (モレキュラー アンド セルラー バイオロジー), 2, 280, (1982)) 400 μgを10 mMトリス-HCl (pH 7.5)、6 mM MgCl<sub>2</sub> および10 mM NaCl からなる溶液300 μLに加え、さらに500 uのKpn I (宝酒造社製、以下特記しない限り制限酵素はすべて宝酒造社製)を加えて、37℃で6時間反応させ、プラスミド中のKpn I部位で切断した。フェノール-クロロホルム抽出後、エタノール

KpnのDNA断片を分離、回収し、約60 μgのポリ(dT)鎖付加pCDV / を得た。該DNAを10 mMトリス-HCl (pH 8.0) および1 mM EDTAからなる溶液500 μLに溶解し、65℃5分間インキュベート後、氷冷して50 μLの5 M NaClを加えた。混合物をオリゴ(dA)セルロースカラム(コラボラティブリサーチ社製)クロマトグラフィーにかけた。ポリ(dT)鎖長が充分なものはカラムに吸着し、これを10 mMトリス-HCl (pH 8.0) および1 mM EDTAからなる溶液で溶出し、ポリ(dT)鎖の付加したpCDV / (以下ベクタープライマーと略記する)27 μgを得た。

次にリンカーDNAの調製を行った。pL / (Okayama & Berg (オカヤマ アンド バーク) Mol. Cell. Biol. (モレキュラー アンド セルラー バイオロジー), 2, 280, (1982)) 約1.4 μgを10 mMトリス-HCl (pH 7.5)、6 mM MgCl<sub>2</sub> および50 mM NaCl からなる溶液200 μLを加えさらに50 uのPst Iを加え、

37℃で4時間反応させ、pL / DNA中の Pst I 部位で切断した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行い、Pst I で切断した pL / DNA 約 1 μg を回収した。該 DNA 約 1 μg を TdT 緩衝液には終濃度 0.25 mM の dGTP を含む溶液 50 μL に加え、さらに TdT (P-L Biochemicals 社製) 5 μg 単位を加えて 37℃で 13 時間インキュベートし、pL / の Pst I 切断部位 3' 末端に (dG) 鎖を約 4 個付加した。フェノール-クロロホルム抽出後エタノール沈殿にて DNA を回収した。該 DNA を 10 mM トリス-HCl (pH 7.5)、6 mM MgCl<sub>2</sub> および 60 mM NaCl からなる緩衝液 100 μL に加え、さらに 80 u の Hind III を加えて 37℃ 3 時間インキュベートし、pL / DNA の Hind III 部位で切断した。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.5 Kb の DNA 断片を DEAE ペーパー法 (Dretzen et al (ドレンゼンら), Anal. Biochem. (アナリティカル バイオケミストリー),

鎖を付加した。該反応物をフェノール-クロロホルムを抽出し、エタノール沈殿により (dC) 鎖の付加した cDNA-ベクター-プライマー DNA を回収した。該 DNA を 10 mM トリス-HCl (pH 7.5)、6 mM MgCl<sub>2</sub> および 60 mM NaCl からなる液 400 μL に溶かし、20 u の Hind III を加え、37℃ 3 時間インキュベートし、Hind III 部位で切断した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿して 0.5 pmole の (dC) 鎖付加 cDNA-ベクター-プライマー DNA を得た。該 DNA 0.08 pmole と前記のリンカー DNA 0.1 μmole を 10 mM トリス-HCl (pH 7.5)、0.1 M NaCl および 1 mM EDTA からなる 40 μL に溶かし、65℃、42℃、0℃でそれぞれ 10 分、25 分、30 分間インキュベートした。20 mM トリス-HCl (pH 7.5)、4 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1 M KCl および 0.1 mM β-NAD の組成で全量 400 μL となるよう反応液を調製した。該反応液に 10 u の大腸菌 DNA リガーゼ (New

England Biolabs 社製) を加え、1/2, 295, (1981) にて回収し、オリゴ (dG) 鎖付きのリンカー DNA (以下単にリンカー DNA と略記する) を得た。

上記で調製したポリ (A) RNA 約 2 μg、ベクター-プライマー 約 1.4 μg を 50 mM トリス-HCl (pH 8.3)、8 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM KCl、0.3 mM DTT、2 mM dNTP (dATP、dTTP、dGTP および dCTP) および 10 u のリボヌクレアーゼインヒビター (P-L Biochemicals 社製) からなる溶液 22.3 μL に溶解し、10 u の逆転写酵素 (生化学工業社製) を加え、37℃で 40 分間インキュベートし、mRNA に相補的な DNA を合成させた。該 DNA をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い RNA-DNA 二重鎖の付加したベクター-プライマー DNA を回収した。該 DNA を 60 μm dCTP および 0.2 μg ポリ (A) を含む TdT 緩衝液 20 μL に溶かし、1 μu の TdT (P-L Biochemical 社製) を加えて 37℃で 8 時間インキュベートし、cDNA 3' 末端に 12 個の (dC)

England Biolabs 社製) を加え、1/℃一夜インキュベートした。該反応液を各 40 μM の dNTP、0.15 mM β-NAD とするよう同成分を追加調製し、5 u の大腸菌 DNA リガーゼ、7 u の大腸菌 DNA ポリメラーゼ I (P-L Biochemicals 社製) および 2 u の大腸菌リボヌクレアーゼ H (P-L Biochemicals 社製) を加え、12℃、25℃で順次 1 時間ずつインキュベートした。

上記反応で cDNA を含む組換え DNA の現状化と RNA-DNA 二重鎖の RNA 部分が DNA に置換され、完全な二重鎖 DNA の組換えプラスミドが生成した。

このものを使用し、常法により作成した大腸菌 MC1064 株のコンピテント細胞を形質転換した。形質転換体約 5 万個をニトロセルロース上に固定した。これらのコロニーをコロニーハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning Cold Spring harbor laboratory PP 329 (1982)) により、常法に従い参考例 1 で得

のに 33 mM トリス・酢酸 (pH 7.9), 66 mM 酢酸カリウム、10 mM 酢酸マグネシウム及び 0.5 mM ジチオスレイトールからなる緩衝液に 2 mM  $\gamma$ -デオキシトリリン酸を加え、40  $\mu$ l の系とし、T4 DNA ポリメラーゼ 4 u により 3' 突出末端を平滑化し、70℃にて 10 分間加熱し、酵素を失活させた後、水に対して透析し、乾燥させた後、50  $\mu$ l の水溶液として保存した。…… フラグメント 1

② 一方、pCDVCL-1 20 μg を緩衝液 H-100 μL 中で Nco I, Hind III 各 20 u にて 37 °C で 2 時間反応させ消化した。このものを 5 % アクリルアミドゲル電気泳動 (89 mM トリス, 89 mM ホウ酸及び 2 mM EDTA からなる緩衝液 10 V/cm、1.5 時間泳動) にて DNA を分離し、ゲルを 0.05 % エタジウムブロマイド水溶液で染色後、340 nm の紫外線の下で分子量の大きい方の 2 本のフラグメントを切り出し、ゲルをガラス棒

#### A. 発現ベクター及び形質転換体の作成

① pCDVCL-15μgを10mMトリス-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl 及び6mM MgCl<sub>2</sub> からなる緩衝液(以下、「緩衝液H」と略記)100μL中で、Pvu 10uと37℃で2時間反応させて消化し、75℃で15分間加熱し、酵素を失活させた後、水に対して、透析して乾燥させた。このも

T G G C A O T T A C A A C A A G A T  
                x                    x x x  
-----G-----T C -C-

T A A C A T G G T T G C A T O  
      x  
-G-----] )

s / ベース ( x : 変位した部分 )

上記プライマー / 50 pmol をキナーゼ緩衝液 (50 mM トリス-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub> 及び 5 mM ジチオスレイトール) / 0.4 μL の系で 20 U の T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより 5' をリン酸化した。

#### ④ ヘテロデュープ・プレックスの形成

フラグメント I 0.05 pmole, フラグメント II 0.05 pmole 及び 5'-リン酸化プライマー 45 pmole に 5 倍濃度のポリメラーゼリガーゼ緩衝液 (0.5 M NaCl, 32.5 mM トリス-HCl (pH 7.5), 4.0 mM MgCl<sub>2</sub> 及び 5 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール) を 12  $\mu$ L 加え、計 34.8  $\mu$ L の系とし、100°C で 3 分間煮沸し、直ちに 30°C の恒温槽に入れ、30 分間放置した。次に、4°C にて

Hind III

プライマー    A C A A C A G A T C T A A G C T T A  
                                x         x         x  
〔元の配列〕〔-----A---A-G-—

30分放置し、更に氷上に10分間放置してヘテロデュープレックスを形成させた。

このヘテロデュープレックスを含む水溶液 / 1.6  $\mu$ l に 2.5 mM 4-デオキシヌクレオチドトリリン酸を 2  $\mu$ l、10 mM ATP を 2  $\mu$ l 加え、さらに 2 u の Klenow 酵素、0.5 u の T4 DNA リガーゼを加え、計 20  $\mu$ l の系にて、16°C一晩反応させ、DNA を環状化させた。

この現状 DNA を含む水溶液  $2 \mu\text{L}$  を用い、常法に従い大腸菌 HB101 株を形質転換し、形質転換体を得た。この形質転換体からプラスミドを常法に従い分離・精製し、制限酵素 Hind III により切断し、5% アクリルアミドゲル電気泳動により 2 つのフラグメントに分れたプラスミドを変異プラスミドとして得た。この場合得られる変異プラスミドには、往々にしてもとのプラスミド（野生型）が混入しているので、この変異プラスミドを用い再度大腸菌 HB101 株を形質

#### ④ ヘテロデュ-プレックスの形成

前記ノ)の④において、上記2)の①~③で得たフラグメントⅠ、Ⅱ及びゲーリン酸化プライマーを使用する以外は同様にしてプラスミド pCV44Bを得た(図-6)。

## J) 特異抗原 cDNA の発現ベクターへの導入

① pCV44H / 0 μg (~ 3 pmol) を、緩衝液 H / 0.0 μL 中で、Hind III 20 u、Sac I 20 u を使い、37℃ にて 2 時間反応させ、切断した。このものを 5% アクリルアミドゲル電気泳動にかけ、467 bp の特異抗原の N 末端をコードする DNA 断片を分離、精製した。…… フラグメント N

② pCV4#B / 0  $\mu$ g (~ 3 pmol) を、緩衝液 H / 0.0  $\mu$ l 中で、Bgl II 2.0 u、Sac I 2.0 u を使い、37℃ にて 2 時間反応させ、切断した。このものを 5% アクリルアミドゲル電気泳動にかけ、836 bp の特異抗原の C 末端をコードする DNA 断片を分離、精製した。……フラグメント C

転換し、変異プラスミドを純化した。

この様にして、プラスミド pCV44H を得た (図-5)。

## 2) C 末端の改変

① pCDVCL-1548 を、前記 1) の ①と同様に処理してフラグメント I を得た。

② pCDVCL-12048を Nco | , Not | 各  
suを用いる以外は前記1)の②と同様に  
してフラグメントⅡを得た。

③ 前記 1) の③と同様にして下記プライマーを合成し、その $\beta$ をリン酸化した。

プライマー      G C A C A A G G A A A A A A A T G

〔元の配列〕〔-----A

Bgl II      Sal I  
 ┌──────────┐ ┌──────────┐  
 A G A T C T G T C G A C G G T T C  
 x x x x x x x x x x  
 G A T A T G T G A A    A - - - -

ACGTAAATTTC 46ベース  
-----}

(×：変異した部分、●：追加部分)

② 発現ベクターである pUS $\Delta$ H 2  $\mu$ S ( ~ / pmol ) を緩衝液 B 中にて Hind III 2 u , Bgl II 2 u を使い、20  $\mu$ L の系で 37  $^{\circ}$ C 2 hr 反応させ切断した。このものを、同容の水飽和フェノールにより抽出して除蛋白し、エーテルにてフェノールを抽出した後、水に対して透析を行い、脱塩し、バキュームポンプにより濃縮して、発現ベクター断片 H B を含む 10  $\mu$ L の水溶液を得た。

④ フラグメント N 0.5 pmol、フラグメント C 0.5 pmol と発現ベクター断片 HB 0.1 pmol とを混合し、10 mM トリス-HCl (pH 7.5)、1 mM ジチオスレイトール、6 mM MgCl<sub>2</sub>、及び 1 mM ATP からなる緩衝液 10  $\mu$ l 中にて T<sub>4</sub> DNA リガーゼ 1 u を加え、37°C で 16 時間反応させた。このものを 3  $\mu$ l 使用し、市販の大腸菌 JM109 コンピタントセルを常法に従い、形質転換した。形質転換体はアンピシリンを 30  $\mu$ g/ml 含む LB 培地 (バクトペプトン 10 g/L、イース

トエキストラクト 5 g/L、NaCl 10 g/L、寒天 15 g/L) にて選択し、特異抗原遺伝子の挿入されている発現ベクター-pCZ44を得た(図-7)。

#### B. 特異抗原の発現

pCZ44を保持している大腸菌JM109株をLBブロスにて、30℃で一晩培養した。このものを50倍希釈となるように新しいLBブロス培地に植菌し、2時間、30℃で振とう培養した。次に、IPTG(イソプロピル-β-D-ガラクトピラノシド)を2 mMになるように培地に加え、さらに3時間30℃にて振とう培養を行った後に、6,500 r.p.m.で10分間の遠心分離により集菌した。このものを0.9% NaCl 及び 10 mM トリス-HCl (pH 7.5) の緩衝液に懸濁し、保存した。

#### C. 特異抗原の発現の確認

上記Bで得られた菌体0.3 ml培養分を、10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(トリス 3 g/L、グリシン 14.4 g/L 及び

0.1% SDS からなる緩衝液、120 V、1時間)にかけた後、ゲルを取り出してニトロセルロースフィルター上に置出し、ろ紙にはさみ、トリス 3 g/L、グリシン 14.4 g/L の緩衝液中で5 V/cm、4℃にて泳動し、ゲル中の蛋白質をニトロセルロースフィルター上にブロッティングした。このニトロセルロースフィルターをTB8緩衝液(10 mM トリス-HCl (pH 7.5) 及び 50 mM NaCl)で軽く洗い、3%ゼラチンを含むTB8緩衝液400 mlに浸し、40℃、1時間振とうを行ってニトロセルロースフィルターのブロッティングを行った。次に非A非B型肝炎特異抗原に対するモノクローナル抗体(OD<sub>200</sub>=4.3)を1%ゼラチンを含むTB8緩衝液に400分の1希釈となるように加え、フィルター1枚につき2 mlになる様にビニール袋にフィルターとともに入れ、室温で16時間反応させた。次に0.05% Tween 20を含むTB8緩衝液400 mlにて10分間3回洗浄し標識2次抗

体である抗マウス IgG-PAP(フォースラディシュベルオキシダーゼ)(Bio Rad社製)を1%ゼラチンを含むTB8緩衝液に1000倍希釈となるように加え、フィルター1枚につき2 mlになる様にビニール袋にフィルターとともに入れ、室温で2時間反応させ、同様に0.05% Tween 20を含むTB8緩衝液400 mlにて10分間3回洗浄した。発色はフィルターを4-Chloro-1-naphthol (Bio Rad社製)1.5 mlを過酸化水素水を含む20 mlのTB8緩衝液に浸して行った。発色終了後、フィルターは水でよく洗い水を入れたビニール袋に入れて冷蔵所に保存した。

この様にして、非A非B型肝炎特異抗原の発現の有無を調べたところ、感染チンパンジー肝臓由来の特異抗原と同じ位置(44 kD)に反応する蛋白質が検出され、大腸菌にて該特異抗原の発現が確認された。(発明の効果)

非A非B型肝炎特異抗原蛋白質を直接診断試

薬として使用する場合には、多量の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質を必要とするが、多量の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質を非A非B型肝炎発症時のチンパンジー等の肝細胞から精製することは、困難なことである。本発明によりチンパンジー等の感染肝細胞を使用することなく、しかも安価に安全に大量の該抗原蛋白質を精製することが出来る。

#### 4 図面の簡単な説明

図-1は、非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする塩基配列を表わす図である。

図中、「-」はその上に示された塩基に相補的な塩基を表わす。

図-2は、ハイブリッドプロモーター-Pacの塩基配列を表わす図である。

図-3は、参考例1で得たcDNAの塩基配列を表わす図である。

図-4は、参考例2で得たcDNAの塩基配列を表わす図である。

図中、第57番から第138番までが非A非

B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする塩基部分  
を表わす。

図-5は、プラスミドpCV\*\*Hを作成するた  
めの概略図を表わす。

図-6は、プラスミドpCV\*\*Bを作成するた  
めの概略図を表わす。

図-7は、プラスミドpCZ\*\*を作成するた  
めの概略図を表わす。

出 願 人 三菱化成工業株式会社  
代 理 人 弁理士 長 谷 川 一  
様 氏 名

図-1(その1)

```

5' ATG GCA GTG ACA ACT CGT TTG ACA TGG TTG
3' ATG GCA GTG ACA ACT CGT TTG ACA TGG TTG

CAT GAA AAG ATC CTG CAA AAT CAT TTT GGA

GGG AAG CGG CTT AGC CTT CTC TAT AAG GGT

AGT GTC CAT GGA TTC CAT AAT GGA GTT TTG

CTT GAC AGA TGT TGT AAT CAA GGG CCT ACT

CTA ACA GTG ATT TAT AGT GAA GAT CAT ATT

ATT GGA GCA TAT GCA GAA GAG GGT TAC CAG

```



Ⅷ - 1 (その2)

GAA	AGA	AAG	TAT	GCT	TCC	ATC	ATC	CTT	TTT
		220			230				240
GCA	CTT	CAA	GAG	ACT	AAA	ATT	TCA	GAA	TGG
		250			260				270
AAA	CTA	GGA	CTA	TAT	ACA	CCA	GAA	ACA	CTG
		280			290				300
TTT	TGT	TGT	GAC	GTT	GCA	AAA	TAT	AAC	TCC
		310			320				330
CCA	ACT	AAT	TTC	CAG	ATA	GAT	GGA	AGA	AAT
		340			350				360
AGA	AAA	GTG	ATT	ATG	GAC	TTA	AAG	ACA	ATG
		370			380				390
GAA	AAT	CTT	GGA	CTT	GCT	CAA	AAT	TGT	ACT
		400			410				420
ATC	TCT	ATT	CAG	GAT	TAT	GAA	GTT	TTT	CGA
		430			440				450
TGC	GAA	GAT	TCA	CTG	GAC	GAA	AGA	AAG	ATA
		460			470				480
AAA	GGG	GTC	ATT	GAG	CTC	AGG	AAG	AGC	TTA
		490			500				510

図-1(その3)

CTG	TCT	GCC	TTG	AGA	ACT	TAT	GAA	CCA	TAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GGA	TCC	CTG	GTT	CAA	CAA	ATA	CGA	ATT	CTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CTG	CTG	GGT	CCA	ATT	GGA	GCT	GGG	AAG	CTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AGC	TTT	TTC	AAC	TCA	GTG	AGG	TCT	GTT	TTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CAA	GGG	CAT	GTA	ACG	CAT	CAG	GCT	TTG	GTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GGC	ACT	AAT	ACA	ACT	GGG	ATA	TCT	GAG	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
TAT	AGG	ACA	TAC	TCT	ATT	AGA	GAC	GGG	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GAT	GGC	AAA	TAC	CTG	CCA	TTT	ATT	CTG	TGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GAC	TCA	CTG	GGG	CTG	AGT	GAG	AAA	GAA	GGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GGC	CTG	TGC	ATG	GAT	GAC	ATA	TCC	TAC	ATC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

図-1 (例4)

TTG	AAC	GGT	<sup>820</sup> AAC	ATT	CGT	<sup>830</sup> GAT	AGA	TAC	<sup>840</sup> CAG
TTT	AAT	CCC	<sup>850</sup> ATG	GAA	TCA	<sup>860</sup> ATC	AAA	TTA	<sup>870</sup> AAT
CAT	CAT	GAC	<sup>880</sup> TAC	ATT	GAT	<sup>890</sup> TCC	CCA	TCG	<sup>900</sup> CTG
AAG	GAC	AGA	<sup>910</sup> ATT	CAT	TGT	<sup>920</sup> GTG	GCA	TTT	<sup>930</sup> GTA
TTT	GAT	GCC	<sup>940</sup> AGC	TCT	ATT	<sup>950</sup> GAA	TAC	TTC	<sup>960</sup> TCC
TCT	CAG	ATG	<sup>970</sup> ATA	GTA	AAG	<sup>980</sup> ATC	AAA	AGA	<sup>990</sup> ATT
CGA	AGG	GAG	<sup>1000</sup> TTG	GTA	AAC	<sup>1010</sup> GCT	GGT	GTG	<sup>1020</sup> GTA
CAT	GTG	GCT	<sup>1030</sup> TTG	CTC	ACT	<sup>1040</sup> CAT	GTG	GAT	<sup>1050</sup> AGC
ATG	GAT	CTG	<sup>1060</sup> ATT	ACA	AAA	<sup>1070</sup> GGT	GAC	CTT	<sup>1080</sup> ATA
GAA	ATA	GAG	<sup>1090</sup> AGA	TGT	GTG	<sup>1100</sup> CCT	GTG	AGG	<sup>1110</sup> TCC

図-1 (例5)

AAG	CTA	GAG	<sup>1120</sup> GAA	GTC	CAA	<sup>1130</sup> AGA	AAA	CTT	<sup>1140</sup> GGA
TTT	GCT	CTT	<sup>1150</sup> TCT	GAC	ATC	<sup>1160</sup> TCG	GTG	GTT	<sup>1170</sup> AGC
AAT	TAT	TCC	<sup>1180</sup> TCT	GAG	TGG	<sup>1190</sup> GAG	CTG	GAC	<sup>1200</sup> CCT
GTA	AAG	GAT	<sup>1210</sup> GTT	CTA	ATT	<sup>1220</sup> CTT	TCT	GCT	<sup>1230</sup> CTG
AGA	CGA	ATG	<sup>1240</sup> CTA	TGG	GCT	<sup>1250</sup> GCA	GAT	GAC	<sup>1260</sup> TTC
TTA	GAG	GAT	<sup>1270</sup> TTG	CCT	TTT	<sup>1280</sup> GAG	CAA	ATA	<sup>1290</sup> GGG
AAT	CTA	AGG	<sup>1300</sup> GAG	GAA	ATT	<sup>1310</sup> ATC	AAC	TGT	<sup>1320</sup> GCA
CAA	GGA	AAA	<sup>1330</sup> AAA	3'					5'

図 - 2

AAAAATTTATTTGCTTTCAGGAAAATTTTTCTGT  
TTTTTAAATAAACGAAAGTCCTTTTAAAAAGACA

ATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTT  
TATTACACACCTTAACACTCGCCTATTGTTAAAG

図-3 (401)

250	260	270	280	290	300
CTA GGA CTA TAT ACA CCA GAA ACA CTG TTT TGT TGT GAC GTT GCA AAA TAT AAC TCC CCA					
Leu Gly Leu Tyr Thr Pro Glu Thr Leu Phe Cys Cys Asp Val Ala Lys Tyr Asn Ser Pro					
310	320	330	340	350	360
ACT AAT TTC CAG ATA GAT GGA AGA AAT AGA AAA GTG ATT ATG GAC TTA AAG ACA ATG GAA					
Thr Asn Phe Gln Ile Asp Gly Arg Asn Arg Lys Val Ile Met Asp Leu Lys Thr Met Glu					
370	380	390	400	410	420
AAT CTT GGA CTT GCT CAA AAT TGT ACT ATC TCT ATT CAG GAT TAT GAA GTT TTT CGA TGC					
Asn Leu Gly Leu Ala Gln Asn Cys Thr Ile Ser Ile Gln Asp Tyr Glu Val Phe Arg Cys					
430	440	450	460	470	480
GAA GAT TCA CTG GAC GAA AGA AAG ATA AAA GGG GTC ATT GAG CTC AGG AAG AGC TTA CTG					
Glu Asp Ser Leu Asp Glu Arg Lys Ile Lys Gly Val Ile Glu Leu Arg Lys Ser Leu Leu					
490	500	510	520	530	540
TCT GCC TTG AGA ACT TAT GAA CCA TAT GGA TCC CTG GTT CAA CAA ATA CGA ATT CTG CTG					
Ser Ala Leu Arg Thr Tyr Glu Pro Tyr Gly Ser Leu Val Gln Gln Ile Arg Ile Leu Leu					
550	560	570	580	590	600
CTG GGT CCA ATT GGA GCT GGG AAG TCT AGC TTT TTC AAC TCA GTG AGG TCT GTT TTC CAA					
Leu Gly Pro Ile Gly Ala Gly Lys Ser Ser Phe Phe Asn Ser Val Arg Ser Val Phe Gln					
610	620	630	640	650	660
GGG CAT GTA ACG CAT CAG GCT TTG GTG GGC ACT AAT ACA ACT GGG ATA TCT GAG AAG TAT					
Gly His Val Thr His Gln Ala Leu Val Gly Thr Asn Thr Thr Gly Ile Ser Glu Lys Tyr					

図-3 (その2)

670	680	690	700	710	720
AGG ACA TAC TCT ATT	AGA GAC GGG AAA GAT	GGC AAA TAC CTG	CCA TTT ATT CTG	TGT GAC	
Arg Thr Tyr Ser Ile	Arg Asp Gly Lys Asp	Gly Lys Tyr Leu	Pro Phe Ile Leu	Cys Asp	
730	740	750	760	770	780
TCA CTG GGG CTG AGT	GAG AAA GAA GGC GGC	CTG TGC ATG GAT	GAC ATA TCC TAC	ATC TTG	
Ser Leu Gly Leu Ser	Glu Lys Glu Gly	Gly Leu Cys Met	Asp Asp Ile Ser	Tyr Ile Leu	
790	800	810	820	830	840
AAC GGT AAC ATT CGT	GAT AGA TAC CAG TTT	AAT CCC ATG GAA	TCA ATC AAA TTA	AAT CAT	
Asn Gly Asn Ile Arg	Asp Arg Tyr Gln	Phe Asn Pro Met	Glu Ser Ile Lys	Leu Asn His	
850	860	870	880	890	900
CAT GAC TAC ATT GAT	TCC CCA TCG CTG	AAG GAC AGA ATT	CAT TGT GTG GCA	TTT GTA TTT	
His Asp Tyr Ile Asp	Ser Pro Ser Leu	Lys Asp Arg Ile	His Cys Val Ala	Phe Val Phe	
910	920	930	940	950	960
GAT GCC AGC TCT ATT	GAA TAC TTC TCC	TCT CAG ATG ATA	GTA AAG ATC AAA	AGA ATT CGA	
Asp Ala Ser Ser Ile	Glu Tyr Phe Ser	Ser Gln Met Ile	Val Lys Ile Lys	Arg Ile Arg	
970	980	990	1000	1010	1020
AGG GAG TTG GTA AAC	GCT GGT GTG GTA	CAT GTG GCT TTG	CTC ACT CAT GTG	GAT AGC ATG	
Arg Glu Leu Val Asn	Ala Gly Val Val	His Val Ala Leu	Leu Thr His Val	Asp Ser Met	
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GAT CTG ATT ACA AAA	GGT GAC CTT ATA	GAA ATA GAG AGA	TGT GTG CCT GTG	AGG TCC AAG	
Asp Leu Ile Thr Lys	Gly Asp Leu Ile	Glu Ile Glu Arg	Cys Val Pro Val	Arg Ser Lys	

図-3 (203)

1090	1100	1110	1120	1130	1140
CTA GAG GAA GTC CAA AGA AAA CTT GGA TTT GCT CTT TCT GAC ATC TCG GTG GTT AGC AAT					
Leu Glu Glu Val Gln Arg Lys Leu Gly Phe Ala Leu Ser Asp Ile Ser Val Val Ser Asn					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
TAT TCC TCT GAG TGG GAG CTG GAC CCT GTA AAG GAT GTT CTA ATT CTT TCT GCT CTG AGA					
Tyr Ser Ser Glu Trp Glu Leu Asp Pro Val Lys Asp Val Leu Ile Leu Ser Ala Leu Arg					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CGA ATG CTA TGG GCT GCA GAT GAC TTC TTA GAG GAT TTG CCT TTT GAG CAA ATA GGG AAT					
Arg Met Leu Trp Ala Ala Asp Asp Phe Leu Glu Asp Leu Pro Phe Glu Gln Ile Gly Asn					
1270	1280	1290	1300		
CTA AGG GAG GAA ATT ATC AAC TGT GCA CAA GGA AAA AAA TAG					
Leu Arg Glu Glu Ile Ile Asn Cys Ala Gln Gly Lys Lys ***					

図-4 (続)

5'	10	20	30	40	50	60	70	80
	GGGGGGCTAC	CCTCAGCTCT	AGCTCATACT	ACAGACAGTA	CAACAGATCA	AGAAGTATGG	CAGTGACAAC	TCGTTTGACA
3'	CCCCCGATG	GGAGTCGAGA	TCGAGTATGA	TGTCTGTCT	GTTGTCTAGT	TCTTCATACC	GTCAGTGT TG	AGCAAACTGT
	90	100	110	120	130	140	150	160
	TGGTTGCATG	AAAAGATCCT	GCAAAATCAT	TTTGGAGGGA	AGCGGCTTAG	CCTTCTCTAT	AAGGGTAGTG	TCCATGGATT
	ACCAACGTAC	TTTTCTAGGA	CGTTTTAGTA	AAACCTCCCT	TCGCCGAATC	GGAAGAGATA	TTCCCATCAC	AGGTACCTAA
	170	180	190	200	210	220	230	240
	CCATAATGGA	GTTTTGCTTG	ACAGATGTTG	TAATCAAGGG	CCTACTCTAA	CAGTGATTTA	TAGTGAAGAT	CATATTATTG
	GGTATTACCT	CAAAACGAAC	TGTCTACAAC	ATTAGTTCCC	GGATGAGATT	GTCAGTAAAT	ATCACTTCTA	GTATAATAAC
	250	260	270	280	290	300	310	320
	GAGCATATGC	AGAAGAGGGT	TACCAGGAAA	GAAAGTATGC	TTCCATCATC	CTTTTGCAC	TTCAAGAGAC	TAAAAATTCA
	CTCGTATACG	TCTTCTCCCA	ATGGTCCTTT	CTTTCATACG	AAGGTAGTAG	GAAAAACGTG	AAGTTCTCTG	ATTTTAAAGT
	330	340	350	360	370	380	390	400
	GAATGGAAAC	TAGGACTATA	TACACCAGAA	ACACTGTTTT	GTTGTGACGT	TGCAAAATAT	AACTCCCCAA	CTAATTTCCA
	CTTACCTTTG	ATCCTGATAT	ATGTGGTCTT	TGTGACAAAA	CAACACTGCA	ACGTTTTATA	TTGAGGGGTT	GATTAAAGGT
	410	420	430	440	450	460	470	480
	GATAGATGGA	AGAAATAGAA	AAGTGATTAT	GGACTTAAAG	ACAATGGAAA	ATCTTGGACT	TGCTCAAAAT	TGTACTATCT
	CTATCTACCT	TCTTTATCTT	TTCACTAATA	CCTGAATTTT	TGTTACCTTT	TAGAACCTGA	ACGAGTTTTA	ACATGATAGA
	490	500	510	520	530	540	550	560
	CTATTCAGGA	TTATGAAGTT	TTTCGATGCG	AAGATTCACT	GGACGAAAGA	AAGATAAAAG	GGGTCAATTGA	GCTCAGGAAG
	GATAAGTCCT	AATACTTCAA	AAAGCTACGC	TTCTAAGTGA	CCTGCTTTCT	TTCTATTTTC	CCCAGTAACT	CGAGTCCTTC
	570	580	590	600	610	620	630	640
	AGCTTACTGT	CTGCCTTGAG	AACTTATGAA	CCATATGGAT	CCCTGGTTCA	ACAAATACGA	ATTCTGCTGC	TGGGTCCAAT
	TCGAATGACA	GACGGAATC	TTGAATACTT	GGTATACCTA	GGGACCAAGT	TGTTTATGCT	TAAGACGACG	ACCCAGGTTA



図-4 (つづ)

650	660	670	680	690	700	710	720
TGGAGCTGGG	AAGTCTAGCT	TTTTCAACTC	AGTGAGGTCT	GTTTTCCAAG	GGCATGTAAC	GCATCAGGCT	TTGGTGGGCA
ACCTCGACCC	TTCAGATCGA	AAAAGTTGAG	TCACTCCAGA	CAAAAGGTTT	CCGTACATTG	CGTAGTCCGA	AACCAACCCG
730	740	750	760	770	780	790	800
CTAATACAAC	TGGGATATCT	GAGAAGTATA	GGACATACTC	TATTAGAGAC	GGGAAAGATG	GCAAATACCT	GCCATTTATT
GATTATGTTG	ACCCTATAGA	CTCTTCATAT	CCTGTATGAG	ATAATCTCTG	CCCTTTCTAC	CGTTTATGGA	CGGTAATAAA
810	820	830	840	850	860	870	880
CTGTGTGACT	CACTGGGGCT	GAGTGAGAAA	GAAGGCGGCC	TGTGCATGGA	TGACATATCC	TACATCTTGA	ACGGTAACAT
GACACACTGA	GTGACCCCGA	CTCACTCTTT	CTTCCGCCGG	ACACGTACCT	ACTGTATAGG	ATGTAGAACT	TGCCATTGTA
890	900	910	920	930	940	950	960
TCGTGATAGA	TACCAGTTTA	ATCCCATGGA	ATCAATCAAA	TTAAATCATC	ATGACTACAT	TGATTCCCCA	TCGCTGAAGG
AGCACTATCT	ATGGTCAAAT	TAGGGTACCT	TAGTTAGTTT	AATTTAGTAG	TACTGATGTA	ACTAAGGGGT	AGCGACTTCC
970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
ACAGAATTCA	TTGTGTGGCA	TTTGTATTTG	ATGCCAGCTC	TATTGAATAC	TTCTCCTCTC	AGATGATAGT	AAAGATCAAA
TGTCTTAAGT	AACACACCGT	AAACATAAAC	TACGGTCGAG	ATAACTTATG	AAGAGGAGAG	TCTACTATCA	TTTCTAGTTT
1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
AGAATTCGAA	GGGAGTTGGT	AAACGCTGGT	GTGGTACATG	TGGCTTTGCT	CACTCATGTG	GATAGCATGG	ATCTGATTAC
TCTTAAGCTT	CCCTCAACCA	TTTGCACCA	CACCATGTAC	ACCGAAACGA	GTGAGTACAC	CTATCGTACC	TAGACTAATG
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
AAAAGGTGAC	CTTATAGAAA	TAGAGAGATG	TGTGCCTGTG	AGGTCCAAGC	TAGAGGAAGT	CCAAAGAAAA	CTTGGATTTG
TTTCCACTG	GAATATCTTT	ATCTCTCTAC	ACACGGACAC	TCCAGGTTTG	ATCTCCTTCA	GGTTTCTTTT	GAACCTAAAC
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280
CTCTTTCTGA	CATCTCGGTG	GTTAGCAATT	ATTCTCTGTA	GTGGGAGCTG	GACCTGTAA	AGGATGTTCT	AATTCTTTCT
GAGAAAGACT	GTAGAGCCAC	CAATCGTTAA	TAAAGGAGACT	CACCCTCGAC	CTGGGACATT	TCCTACAAGA	TTAAGAAAGA

図-4 (その3)

1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360
GCTCTGAGAC	GAATGCTATG	GGCTGCAGAT	GACTTCTTAG	AGGATTTGCC	TTTTGAGCAA	ATAGGGAATC	TAAGGGAGGA
CGAGACTCTG	CTTACGATAC	CCGACGTCTA	CTGAAGAATC	TCCTAAACGG	AAAACTCGTT	TATCCCTTAG	ATTCCCTCCT
1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
AATTATCAAC	TGTGCACAAG	GAAGAAAAATA	GATATGTGAA	AGGTTACAGT	AAATTTCTCT	ACATCACAGA	AGATTAAAT
TTAATAGTTG	ACACGTGTTT	CTTTTTTTAT	CTATACACTT	TCCAAGTGCA	TTTAAAGGAG	TGTAGTGTCT	TCTAATTTTA
1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520
TCAGAAAGGA	GAAACACAG	ACCAAAGAGA	AGTAACTAAG	ACCAAAGGGA	TGTGTTTTAT	TAATGTCTAG	GATGAAGAAA
AGTCTTTCCT	CTTTTGTGTC	TGGTTTCTCT	TCATTGATTC	TGGTTTCCCT	ACACAAAATA	ATTACAGATC	CTACTTCTTT
1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
TGCATAGAAC	ATTGTAGTAC	TTGTAAATAA	CTAGAAATAA	CATGATTTAG	TCATAATTGT	GAAAAATAAT	AATAATTTTT
ACGTATCTTG	TAAACATCATG	AACATTTATT	GATCTTTATT	GTAATAAATC	AGTATTAACA	CTTTTTATTA	TTATTAAAAA
1610	1620	1630	1640	1650	1660		
CTTGGAATTA	TGTTCTGTAT	CTGTGAAAAA	ATAAATTTCT	TATAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAA 3'	
GAACCTAAAT	ACAAGACATA	GACACTTTTT	TATTTAAAGA	ATATTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTT 5'	

図 - 5

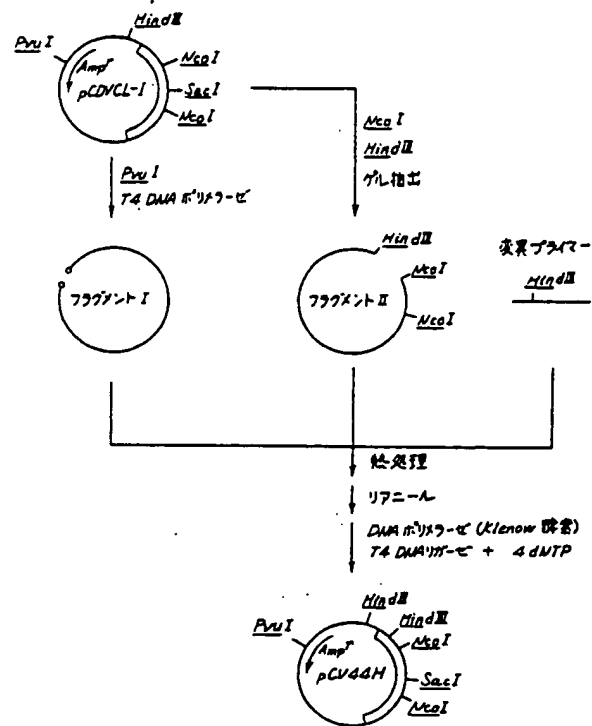


図 - 6

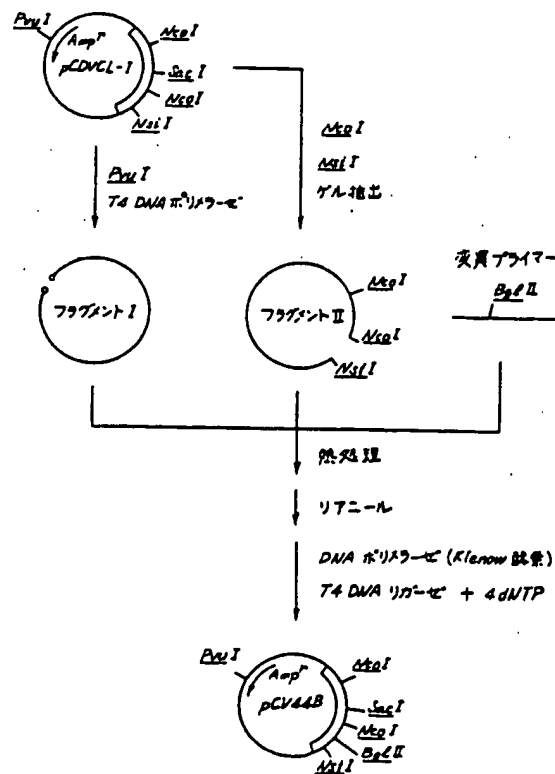
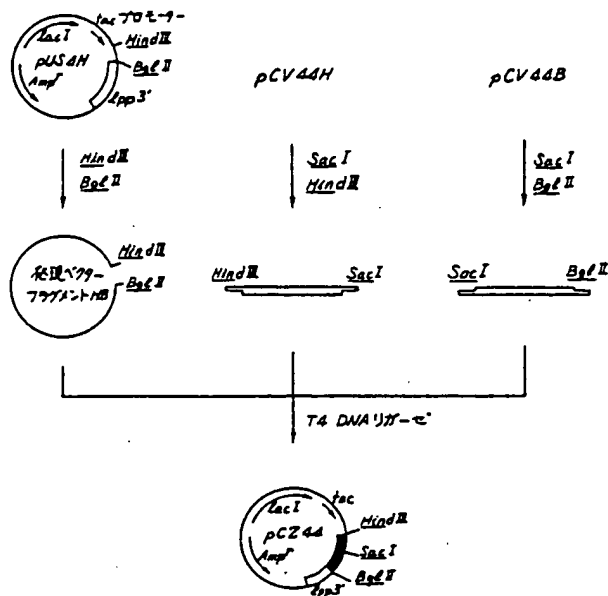


図 - 7



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 4

C 12 P 21/02  
 //(C 12 P 21/02  
 C 12 R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

C-6712-4B

⑦発明者	寺西 豊	神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
⑦発明者	高橋 和展	神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
⑦発明者	中西 重忠	京都府京都市左京区岩倉長谷町517-116
⑦発明者	喜多村 直実	大阪府守口市八雲東町2-272